

To Be Mailed

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-282322

(43) 公開日 平成4年(1992)10月7日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K	37/24	8314-4C		
	37/02	8314-4C		
	37/04	8314-4C		
	37/12	8314-4C		
	37/64	8314-4C		

審査請求 未請求 請求項の数10(全 6 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平3-67665	(71) 出願人	000003296 電気化学工業株式会社 東京都千代田区有楽町1丁目4番1号
(22) 出願日	平成3年(1991)3月8日	(72) 発明者	三好 照三 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社総合研究所内
		(72) 発明者	三村 修治 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社総合研究所内
		(74) 代理人	弁理士 斉藤 武彦 (外2名)

(54) 【発明の名称】 生物活性ペプチド製剤

(57) 【要約】

【目的】 医薬製剤として臨床応用に適したものを提供する。

【構成】 トランスフォーミング成長因子及び蛋白分解酵素阻害剤から選ばれた生物活性ペプチドにヒアルロン酸またはその非毒性塩を配合して、製剤を得る。更に高分子物質を配合することによってもより改良された医薬用製剤が得られる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 トランスフォーミング成長因子（TGF）及び蛋白分解酵素阻害剤から成る群から選ばれた生物活性ペプチドと、ヒアルロン酸又はヒアルロン酸の非毒性塩とから成ることを特徴とする生物活性ペプチド製剤。

【請求項2】 該蛋白分解酵素阻害剤がコラーゲナーゼインヒビター、トリプシンインヒビター、メタロプロテナーゼインヒビター、又はエラスターゼインヒビターである請求項1に記載の製剤。

【請求項3】 該製剤が、固体、液体又はゲル状の半液体の投与形態のものである請求項1に記載の製剤。

【請求項4】 該製剤が、抗ウィルス剤、老化改善剤、創傷治療剤、抗炎症剤、又は骨関節疾患治療剤として用いられるものである請求項1に記載の製剤。

【請求項5】 トランスフォーミング成長因子（TGF）及び蛋白分解酵素阻害剤から成る群から選ばれた生物活性ペプチド、ヒアルロン酸又はヒアルロン酸の非毒性塩、及びヒアルロン酸又はその非毒性塩と共に生体に投与しうる高分子物質とからなることを特徴とする生物活性ポリペプチド製剤。

【請求項6】 該蛋白分解酵素阻害剤がコラーゲナーゼインヒビター、トリプシンインヒビター、メタロプロテナーゼインヒビター又はエラスターゼインヒビターである請求項4に記載の製剤。

【請求項7】 該高分子物質が高分子物質類のなかから選ばれた1種又は2種以上のものである請求項4に記載の製剤。

【請求項8】 該ヒアルロン酸またはその非毒性塩と共に生体に投与しうる高分子物質が、アテロコラーゲン、ゼラチン、アルブミン、フィブリン、フィブリノーゲン、ポリリジン、ポリグルタミン酸等の蛋白質及びキチン、コンドロイチン硫酸、コロミン酸又はそれらの脱アセチル化物、デキストラン、シクロデキストラン、DEAE-デキストラン、イヌリン、ラミナラン等の多糖類及びポリ乳酸、ポリグリコール酸又はそれらのコポリマーあるいはヘテロポリマー、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロース等の合成高分子から選ばれたものである請求項4に記載の製剤。

【請求項9】 該製剤が、固体、液体又はゲル状の半液体の投与形態のものである請求項4に記載の製剤。

【請求項10】 該製剤が、抗ウィルス剤、老化改善剤、創傷治療剤、抗炎症剤、又は骨関節疾患治療剤として用いられるものである請求項4に記載の製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、改良された特性を有する生物活性ペプチド製剤に関し、さらに詳しくは、創傷治癒作用、抗炎症作用及び骨関節疾患治癒作用などを有

して有用なトランスフォーミング成長因子及び蛋白分解酵素阻害剤ペプチドの医薬用製剤に関する。これら本発明の製剤は臨床用途に適したものである。

【0002】

【従来技術】近年種々な生物活性ペプチド類に関する研究が活発に行われ、その作用機序等が明らかになるとともに新規医薬品の開発へと進展してきている。しかし生物活性ペプチド類の多くは、生体内での効果持続時間が短く、有効濃度を維持することは極めて困難である。そのため生物活性ペプチド類を臨床に用いる場合、高価な薬剤を出来る限り少量で有効性を発揮させ、かつ投与回数も少なく一定濃度に維持し長時間効果が持続しうべく投与形態の検討がなされてきた。ヒアルロン酸を含有する医薬製剤としては、ヒアルロン酸と生物活性ペプチド類とを化学的に結合させてなる場合とヒアルロン酸と薬剤とを混合することからなる場合とがあり、このような特許例としては、特開昭61-236732、同62-129226、特開平1-319427、同2-213、同2-231429等があるがそれとて実用上の効果等で課題が残されていた。

【0003】

【課題の解決】本発明は、創傷治癒作用、抗炎症作用及び骨関節疾患治癒作用を有するトランスフォーミング成長因子（TGF）及び蛋白分解酵素阻害剤から成る群から選ばれた生物活性ペプチドと、ヒアルロン酸又はヒアルロン酸の非毒性塩とから成る医薬製剤を提供することからなる。

【0004】さらに本発明は、該トランスフォーミング成長因子及び蛋白分解酵素阻害剤から成る群から選ばれた生物活性ペプチド及びヒアルロン酸又はヒアルロン酸の非毒性塩、そしてヒアルロン酸又はその非毒性塩と共に生体に投与しうる高分子物質とからなる大変優れた性能を有する医薬製剤を提供するものである。

【0005】本発明者らは、生物活性ペプチド製剤、特にトランスフォーミング成長因子あるいは蛋白分解酵素阻害剤を含有する生物活性ペプチド製剤の改良を種々試みた結果、ヒアルロン酸を該製剤中に加えることにより、該生物活性ペプチド製剤単独に用いる場合に比して優れた特性を得られることを見出した。

【0006】特に、こうして得られた製剤は、優れた治癒効果、優れた薬剤放出効果、優れた安定性、などの作用効果が期待できる。

【0007】更に本発明者らは、このような知見に基づいて研究を進め、該生物活性ペプチドとヒアルロン酸との配合製剤中に、更に高分子物質の1種又は2種以上を適量共存させることにより、一層優れた特性が得られることを見出した。特に、該生物活性ペプチド、ヒアルロン酸、及び高分子物質を互いに選択することにより、複合体を形成させることができ、こうして得られる複合体はさらに優れた特性を示すことを見出した。このように

複合体を形成したものは、その利用性などが優れたり、持続性が増すなどの大変に優れたものである。かくして得られる製剤は、優れた治療効果、優れた薬剤吸収性、優れた薬剤放出性、優れた薬剤安定性に加えて、製剤製造加工上の様々な利点が期待しうるものである。これらの特性の代表的なものとしては、作用効果の持続時間の延長、効果発現パターンの調節、製剤の保存、安定性の増加、製剤の分解変質の防止、などがあげられよう。

【0008】トランスフォーミング成長因子は、血液中に微量存在することが知られており、細胞培養法あるいは、遺伝子組換えの手法を用いたり、人尿から単離処理するなどして得られる生物活性ペプチドの一種であり、様々な生物活性を有しており、例えば、創傷、火傷、関節炎などの治療用剤として期待されている。

【0009】本発明において用いられるトランスフォーミング成長因子としては天然物由来の原料から抽出分離せられて得られたもの、人工的に化学合成あるいは修飾によって得られたもの、遺伝子組換え法によって得られたものなどであってよい。特に遺伝子組換え法によって得られたものが、好適に使用しうる。

【0010】蛋白分解酵素阻害剤としては、特にコラーゲナーゼインヒビター、トリプシンインヒビター、メタロプロテイナーゼインヒビター、エラスターゼインヒビターなどがあげられる。これら蛋白分解酵素阻害剤は、生体蛋白組織の分解酵素の作用を阻害する活性を有することから、例えば、関節リウマチ等の関節炎、ウィルス蛋白の分解を阻害する意味での抗ウィルス剤、動脈硬化、各種組織の老化等の治療用剤として期待されている。

【0011】このこれら蛋白分解酵素阻害剤は、微生物からの醗酵法を利用した方法、種々の生体組織から分離抽出することにより、人工的に化学合成あるいは修飾によって得られたもの、遺伝子組換え法によって得られたものなどであってよい。特に遺伝子組換え法及び微生物の醗酵法で得られたものが好適に使用できる。

【0012】ヒアルロン酸はN-アセチルグルコサミンとグルクロン酸のくり返し単位からなる重合体であり、自然界に広く存在し、多くの哺乳類中に見出される。例えば、鶏冠から抽出されたヒアルロン酸が、変形性膝関節症の治療剤として使用され、また、ある種のバクテリア、例えばストレプトコッカス属によって産生されてヒアルロン酸も、医薬品として開発されつつある。本発明に用いるヒアルロン酸は、遊離の形でもよく又はその塩でもよく例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩等の非毒性塩が挙げられる。本発明に用いるヒアルロン酸としては、特に起源を問わない。

【0013】しかしながら、上記のようにある種のバクテリア、例えばストレプトコッカス属により産生されるヒアルロン酸は、比較的均一なより高分子形態のものが高い純度で得られることから好ましい。特に、本発明の

製剤においては、薬剤の効果持続時間とその使用ヒアルロン酸の分子量との間には密接な関係が認められ、ヒアルロン酸のうち高純度のものである、その分子量が特定のものが好ましい。このように、その使用ヒアルロン酸として特定の分子量のものを使用することにより、本発明の製剤では種々の医薬製剤して望ましい特性のものを得ることができる。ヒアルロン酸のうち高純度で、特定の分子量のものは、前記トランスフォーミング成長因子あるいは蛋白分解酵素阻害剤と組み合わせることにより、種々の医薬製剤として望ましい特性のものとなる。

【0014】ヒアルロン酸又はその塩は、該生物活性ペプチドに対して種々の量で使用する事ができる。ヒアルロン酸又はその塩の濃度はその分子量にもよるが、0.05~4重量%の範囲のものが用いられる。特にヒアルロン酸又はその塩は、該生物活性ペプチドに対して、トランスフォーミング成長因子の場合、5~100倍量、また蛋白分解酵素阻害剤の場合にも5~100倍量で用いると一層の優れた特性が期待できる。また、その塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩等があげられ、薬学的に安全に用いられるものが好ましく使用できる。また、ヒアルロン酸は、種々の分子量のものが使用できるが、場合によっては75万~300万程度のものが、特に好ましい特性を付与する。また、ヒアルロン酸の純度は、均一な分子量を有し、タンパク質、核酸、発熱物質等の不純物を含まないものが特に好ましい性質を付与する。

【0015】次に、本発明に従えば、上記生物活性ペプチドとヒアルロン酸又はその非毒性塩とからなる配合剤には、ヒアルロン酸又はその塩と共に生体投与することが可能な高分子物質をさらに配合することができる。このような高分子物質はその1種又は2種以上、例えば3種又は4種を配合することができる。このような配合は、生物活性ペプチドに応じて、あるいは、使用ヒアルロン酸の種類に応じて選択することができる。

【0016】該高分子物質としては、アテロコラーゲン、ゼラチン、アルブミン、フィブリン、フィブリノーゲン、ポリリジン又はポリグルタミン酸などの天然由来又は人工的に合成された蛋白質、あるいはそれらの加水分解又は修飾物など、キチン、コンドロイチン硫酸、コロミン酸又はそれらの脱アセチル化物、デキストラン、DEAE-デキストラン、シクロデキストラン、イヌリン、ラミナラン等の多糖類、さらにポリ乳酸、ポリグリコール酸又はそれらのコポリマーあるいはヘテロポリマー、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロース等の合成高分子などがあげられる。

【0017】本発明で加えられる高分子物質はヒアルロン酸と相互作用して、効果発現に望ましい働きをなす。例えば、これら高分子物質は、使用する高分子物質は、その種類にもよるが、本発明の目的に沿って、ヒアルロ

ン酸の量及び使用該生物活性ペプチドに応じて、種々の量用いることができる。

【0018】本発明の配合物は、固体または液体の形態、さらにはゲル状の半液体の形態にすることができ、固体または液体の医薬用担体または賦形剤、安定剤等を添加して適切な製剤形態とすることができる。このような添加物のうちには、炭素数2-8の水溶性脂肪族カルボン酸、適当な界面活性剤、電解質、防腐剤、酸化防止剤などがあげられる。ヒアルロン酸と相互作用しより強固な高分子マトリックスを形成したり、又特に蛋白質の場合にはヒアルロン酸と強く結合し、ヒアルロン酸に曳糸性をもたすような粘性等の物性変化をきたしたりすることにより薬剤の効果発現保持時間、発現パターンを調節したり薬剤の安定化したりする働きがある。顆粒剤、錠剤もしくは液剤などの使用形態に応じ適当な高分子物質と製造条件が選択されるが、一般的には、高分子物質の使用量はヒアルロン酸に対し0.1~1.5倍量で複合体形成pHは4~10好ましくは6~8である。臨床上及び製造上の優れた利点を得ることができる。この他の添加剤としては、pH調整剤、基剤、ゲル安定化剤、湿潤剤等を適宜選択しうる。

【0019】このカルボン酸としては、例えばモノカルボン酸、ジカルボン酸、トリカルボン酸等があげられる。モノカルボン酸としては、低級脂肪酸、1~7個の水酸基を有するモノカルボン酸などがあげられ、ジまたはトリカルボン酸としてはアルカン鎖中に任意に2~3個のカルボキシル基を有するものがあげられ、それらはまた任意に1~3個の水酸基を含有してよい。さらにこれらカルボン酸はアミノ基を有することもできる。これらカルボン酸の具体例としては、酢酸、プロピオン酸、乳酸、グルコン酸、グルクロン酸、マロン酸、コハク酸、クエン酸、アスコルビン酸、酒石酸、リンゴ酸、グルタル酸、アスパラギン酸、グルタミン酸などがあげられ、これらのものは部分的に塩とされたり、エステル化されたりされることもできる。

【0020】適当な界面活性剤としては、医薬添加剤として許容されるものがあげられ、例えばソルビタンモノパルミテート、ソルビタントリステアレート、ソルビタンセスキオレエートなどのソルビタン脂肪酸エステル類；ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレンモノオレエートなどのポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類；グリセリンモノステアレート、グリセリン・ヤシ油脂肪酸エステル、グリセリンモノオレエート、アセチル化グリセリンモノステアレート、アセトアセチル化グリセリンモノステアレートなどのグリセリン脂肪酸エステル類；プロピレングリコールモノラウレートなどのプロピレングリコール脂肪酸エステル類；ポリオキシエチレングリセリンモノステアレートなどのポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル類；ポリオキシエチレンモノステアレート、ポリ

オキシエチレンオレエートなどのポリオキシエチレン脂肪酸エステル類；ポリオキシエチレンラウリルエーテル、ポリオキシエチレンセチルエーテル、ポリオキシエチレンオレイルエーテルなどのポリオキシエチレンアルキルエーテル類；ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテルなどのポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル類；ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリオキシエチレンラノリンなどのポリオキシエチレン誘導体類；ポリオキシエチレンステアリルアミン、ポリオキシエチレンオレイン酸アミンなどのポリオキシエチレンアルキルアミンおよびアミド類；ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸トリエタノールアミン、ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸トリエタノールアミンなどのアルキル硫酸エステル塩およびポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸エステル塩類；ピリドキシン脂肪酸エステル類；アスコルビルジパルミテートなどのアスコルビン酸脂肪酸エステル類；ショ糖ラウレートなどのショ糖脂肪酸エステル類；リジウムラウレートなどのカルボン酸塩類；ラウリルリン酸ナトリウム、ポリオキシエチレンセチルエーテルリン酸ナトリウムなどのアルキルリン酸エステルおよびポリオキシエチレンアルキルエーテルリン酸エステル類；ヤシ油脂肪酸モノグリセリド硫酸エステルナトリウムなどの硫酸エステル塩類；大豆レシチン、ケファリン、リポイノシトールなどのリン脂質類；セネガサポニンなどのサポニン類、ウルソデオキシコール酸ナトリウム、グリココール酸ナトリウムなどのコール酸およびその塩類などが挙げられ、これらの1種又は2種以上が用いられる。

【0021】適当な電解質としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム、炭酸ナトリウム、硫酸マグネシウムなどがあげられる。防腐剤としては、メチルパラベン、ソルビン酸、ベンジルアルコール、クロールブタノールなどがあげられる。

【0022】適当な酸化防止剤としては、亜硫酸水素ナトリウム、ブチルヒドロキシアニソール、アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウム、トコフェロールなどがあげられる。

【0023】適当なpH調整剤としては、適当な酸、塩基または緩衝液などがあげられ、例えば水溶性脂肪族カルボン酸、無機酸、有機又は無機塩基があげられ、具体的には塩酸、ホウ酸、リン酸、硫酸、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液などがあげられる。

【0024】基剤のうち水性ゲル基剤としては、たとえば、トラガントガム、アカシアガム、カラヤガム、グアヤクガム、キサンタンガム等の天然ガス類、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリビニルメチルエーテル、カルボキシポリメチメン等のビニルポリマー、デンプン、ペクチン、アルギン酸ソーダなどがあげられる。

【0025】またその他の基剤としては、カカオ脂、バーム油、バーム核油、ヤシ油、分画ココナツ油、ラード、ウィテップゾールRなどトリグリセリドを主体とする油脂類；ラノリン、還元ラノリンなどのロウ類；ワセリン、スクワレン、スクワランなどの炭化水素類；カプリン類、ラウリン酸、ステアリン酸、オレイン酸などの中長鎖脂肪酸類；ラウリルアルコール、セタノール、ステアリルアルコール、オレイルアルコールなどの高級アルコール類；ステアリン酸ブチル、マロン酸ジラウリルなどの脂肪酸エステル類；トリオレイン、トリステアリンなどのグリセリン中長鎖カルボン酸エステル又はグリセリンアセト酢酸エステルなどのグリセリン-置換カルボン酸エステル等のグリセリンエステル類；マクロゴール、セトマクロゴールなどのポリエチレングリコール類などがあげられ、これら1種又は2種以上が用いられる。

【0026】本発明の製剤は通常の方法を適用することにより、その製造を行うことができる。例えば、液剤の場合、ヒアルロン酸又はその無毒性塩を含む溶液に、生物活性ペプチドを適当なpH調整剤等の入った溶液に溶解又は懸濁化したものを添加し、攪拌する。この場合、必要に応じて前記したような添加剤を加えることにより、最適なものとする事ができる。こうして得られた製剤は、さらに高分子物質を添加して、より良好な製剤とすることができ、特に複合体を形成せしめて、大変に優れた製剤とすることができる。

【0027】このようにして得られた溶液剤、さらに任意にpH調整剤、防腐剤なども加えることができ、更に凍結乾燥したり、減圧下に液を濃縮したり、あるいは適当なゲル化剤を加えるなどして、固体あるいは粉末体にしたたり、ゲル化物にすることができる。本発明に従えば、適宜必要に応じて再溶解、あるいは分散化処理することもでき、更には適当に加熱あるいは冷却処理をして所望の製剤とすることができる。

【0028】本発明の製剤は、剤型、主薬の種類、対象動物（例、マウス、ラット、ウシ、ウマ、人等の温血動物）、投与目的により変えることができるが、その1回投与量は有効量であればよく、例えば、約1mg-500mg/kg体重の範囲から適宜選択することができる。また投与回数も上記と同様に変えることができるが、週に1

【0029】

【実施例】以下に実施例をあげて本発明について具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0030】実施例1（液体製剤）

ヒアルロン酸ナトリウム（平均分子量210万）の0.5wt%生理食塩水溶液100ml（pH7.1）にヒトTGFβ-1（血小板由来）10mgを無菌条件下で混合する。得られた製剤は眼角膜の創傷治癒に適用される。このものは、製剤安定性試験及び溶解性試験で好ましいものであることが確認された。またその製剤の体内持続性も優れたものである。

【0031】実施例2

10 実施例1で得られた製剤にそれぞれアテロコラーゲン（シグマ社製）、ゼラチン、アルブミン、フィブリン、フィブリノーゲン、ポリリジン、ポリグルタミン酸から選ばれたものの一つを0.3wt%含有する生理食塩液100ml（pH7.1）を加えて、液剤とした。それぞれ優れた特性の製剤である。

【0032】実施例3

20 実施例1で得られた製剤にそれぞれ、キチン、コンドロイチン硫酸、コロミン酸、脱アセチル化キチン（キトサン（平均分子量：1000））から選ばれたものの一つを0.2wt%含有する生理食塩液100ml（pH7.1）を加え、液剤とした。それぞれ良好な特性を示す製剤である。

【0033】実施例4

30 実施例1で得られた製剤にそれぞれ、デキストラン、シクロデキストラン、DEAE-デキストラン、イヌリン、ラミナラン、ポリ乳酸（分子量：5000）、ポリグリコール酸（分子量：10000）から選ばれたもののうちの一つを0.05wt%含有する生理食塩液（pH7.1）50mlを加え、液剤とした。それぞれ優れた性状を示す。

【0034】実施例5（液体製剤）

コラーゲナーゼインヒビター（微生物由来）10μgを含むヒアルロン酸ナトリウムの0.5wt%生理食塩水溶液50mlに脱アセチル化キチン（キトサン）5%溶液5mlを添加混合し、複合体を形成させた。このものは関節炎治療剤として使用される。こうして得られた製剤は、ラットを用いての血中濃度追跡試験で持続化された特性を有することが示される。

【0035】

40 【発明の効果】本発明の製剤は、ヒアルロン酸を配合されることにより、良好な特性を有し、治療用薬剤として大変優れている。さらに、その製剤としての加工性においても好ましい。また、高分子物質を加えることにより複合体を形成させて、更に優れた製剤が得られる。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 47/30	C	7329-4C		
	H	7329-4C		
47/36	C	7329-4C		
	E	7329-4C		
	H	7329-4C		
//(A 6 1 K 37/02				
47:36		7329-4C		
47:30)		7329-4C		
(A 6 1 K 37/64				
47:36		7329-4C		
47:30)		7329-4C		